

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESEN

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT (Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 25 NOV 2004

WIPO

PCT



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 38858	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/PEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/AT 03/00232	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 11.08.2003	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 09.08.2002
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N5/06		
Anmelder DR. H. ZECH GMBH et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 7 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:
 - ☒ Grundlage des Bescheids
 - ☐ Priorität
 - ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
 - ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
 - ☒ Begründete Feststellung nach Regel 66.2 a)ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
 - ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
 - ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
 - ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 04.03.2004	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 24.11.2004
Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Kalsner, I Tel. +49 89 2399-8708 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):

Beschreibung, Seiten

1-16, 19-23 in der ursprünglich eingereichten Fassung
17, 18 eingegangen am 03.09.2004 mit Telefax

Ansprüche, Nr.

1-20 eingegangen am 03.09.2004 mit Telefax

Zeichnungen, Blätter

1/3-3/3 in der ursprünglich eingereichten Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um:

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/AT 03/00232

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

- | | |
|--------------------------------|---------------------|
| 1. Feststellung | |
| Neuheit (N) | Ja: Ansprüche 1-19 |
| | Nein: Ansprüche |
| Erfinderische Tätigkeit (IS) | Ja: Ansprüche 1-19 |
| | Nein: Ansprüche |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (IA) | Ja: Ansprüche: 1-19 |
| | Nein: Ansprüche: |

2. Unterlagen und Erklärungen:

siehe Beiblatt

Zu Abschnitt V: Begründete Feststellung hinsichtlich Neuheit, erfinderischer Tätigkeit und gewerblicher Anwendbarkeit

1) Neuheit und erfinderische Tätigkeit

- 1.1) Die vorliegende Anmeldung bezieht sich auf ein Verfahren zur Erzeugung von Zelllinien, wobei differenzierfähige Spenderzellen, die nicht-embryonalen Ursprungs sind, einer nicht-humanen Morula oder Blastozyste zugeführt werden. Die Methode ist weiter dadurch definiert, daß die Zellen der Morula über eine eingeschränkte Überlebensfähigkeit verfügt.
- 1.2) Eine Methode, wie sie in **Anspruch 1** und den davon abhängigen **Ansprüchen 2-20** beschrieben ist, ist nicht im Stand der Technik offenbart und entspricht daher formell den Erfordernissen von Art. 33(2)(3) PCT.

Neue Seiten 17 und 18

PCT/AT 03/00232

17

Spenderzellen sind, obwohl die nach Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens sich entwickelnde Schwein-Blastozyste keineswegs genetisch ident zu den Spenderzellen ist. In einem späteren Entwicklungsstadium der Schwein-Blastozyste können neue, differenzierfähige Zellen, differenzierte Zelllinien oder auch ganze Organe mit genetischer Identität zu den humanen Spenderzellen und im Optimalfall auch immunologischer Kompatibilität zum Spenderorganismus isoliert werden, ohne dass dies den Einsatz humaner embryonaler Stammzellen erfordern würde.

Anspruch 17 sieht eine vorteilhafte Art der Zufuhr der Spenderzelle in die Wirtsblastozyste vor, indem die Zufuhr durch Injektion erfolgt.

Anspruch 18 sieht eine vorteilhafte Art der Zufuhr der Spenderzelle in die Wirtsmorula vor, indem die Zufuhr durch Aggregation erfolgt.

Anspruch 19 bezieht sich auf eine spezielle Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, der zu Folge es sich bei den Spenderzellen um humane Zellen handelt. Es ist jedoch durchaus möglich, dass die Morula oder Blastozyste, denen die Spenderzellen zugeführt werden, dennoch nicht-humanen Ursprungs sind. Da die aus dem erfindungsgemäßen Verfahren geernteten Zelllinien oder auch Organstrukturen genetisch ident zu den Spenderzellen sind, eignen sie sich zur Verwendung als Präparat zur diagnostischen und therapeutischen Intervention und für wissenschaftliche Zwecke bei Erkrankungen des Menschen oder anderer Säugetiere, zur Erzeugung von Organstrukturen zur therapeutischen, diagnostischen oder wissenschaftlichen Anwendung. Bei den erwähnten Erkrankungen könnte es sich etwa um Herz/Kreislaufkrankungen, neurologische Erkrankungen, Fortpflanzungsstörungen, Krebs, Augenerkrankungen, hormonelle

Störungen, Lungenerkrankungen, metabolische Störungen, vererbte Erkrankungen, Erkrankungen des Bewegungs-, Stütz- und Bandapparates, Erkrankungen der Haut, des Knorpels und des Knochens, sowie Autoimmunstörungen handeln.

Anspruch 20 bezieht sich auf eine spezielle Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, der zu Folge es sich bei den Spenderzellen um nicht-humane Zellen handelt.

Eine mögliche Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird nun anhand der beiliegenden Figuren 1 bis 3 näher beschrieben.

Figur 1 soll hierbei schematisch darstellen, wie gemäß einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zunächst eine tetraploide Blastozyste 1 hergestellt wird. Die von der Zona Pellucida 3 umgebenen Blastomeren 2 eines Zwei-Zell-Präembryos können etwa durch Elektrofusion in einen Ein-Zell-Präembryo mit vierfachem Chromosomensatz umgewandelt werden. Techniken zur Erzeugung tetraploider Präembryonen sind gemäß dem Stand der Technik bekannt und etwa in [6, 7, 23-27] beschrieben. Der Präembryo vollzieht weiterhin Zellteilungen der Blastomeren und entwickelt sich in weiterer Folge zu einer Blastozyste 1. In Fig. 1 sind in schematischer Weise die innere Zellmasse 4 sowie die Trophoblasten 5 angedeutet.

Andererseits wird eine etwa von Nabelschnurblut stammende Probe oder auch eine von einem erwachsenen Organismus, etwa von Fettgewebe, entnommene Probe einer Aufbereitung unterzogen, die auf eine Konzentrationserhöhung der enthaltenen Stammzellen abzielt. Techniken zur Aufbereitung einer Probe zwecks Herstellung einer gereinigten Zellfraktion sind ebenfalls gemäß dem Stand der Technik bekannt und etwa in [28, 32, 34] beschrieben. Das Ergebnis der Aufbereitung sind

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Erzeugung von Zelllinien oder einzelner Organe, wobei differenzierfähige Spenderzellen (6) einer nicht-humanen Morula (7) oder nicht-humanen Blastozyste (1) zugeführt werden, die unter Bedingungen kultiviert werden, die eine weitere Entwicklung der Morula (7) oder Blastozyste (1) in Stadien, in denen neu gebildete Zelllinien mit höherem Differenzierungsgrad auftreten, gestatten, sowie die Isolierung dieser Zelllinien oder Weiterdifferenzierung dieser Zelllinien in Organe durch Transfer der Blastozyste (1) in ein Leihmuttertier umfasst, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Zellen (2) der Morula (7) oder der inneren Zellmasse (4) der Blastozyste (1) über eine im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp eingeschränkte Überlebensfähigkeit verfügen oder deren Überlebensfähigkeit durch geeignete Kultivierungsbedingungen herabgesetzt wird, und die der Morula (7) oder Blastozyste (1) zugeführten Spenderzellen (6) unterschiedlichen Differenzierungsgrad aufweisen sowie nicht-embryonalen Ursprungs sind.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Spenderzellen (6) natürlich vorkommende Stammzellen enthalten.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Zellen (2) der Morula (7) oder der inneren Zellmasse (4) der Blastozyste (1) in einer Kulturschale (8, 9, 10) aufbereitet sind oder zur Aufbereitung einer löslichen Matrixfraktion dienen.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Spenderzellen (6) aus Nabelschnurblut gewonnen werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Spenderzellen (6) aus der Plazenta gewonnen werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Spenderzellen (6) aus dem Knochenmark gewonnen werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Spenderzellen (6) aus dem Fettgewebe gewonnen werden.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen (2) der Morula (7) oder der inneren Zellmasse (4) der Blastozyste (1) tetraploide Zellen sind.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen (2) der Morula (7) oder der inneren Zellmasse (4) der Blastozyste (1) Zellen aufweist, deren Genom Vektoren enthält, die im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp eine letale Sensibilität gegenüber entsprechenden Kultivierungsbedingungen verursachen.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Genom der Spenderzellen (6) einen Vektor enthält, der eine Resistenz gegen Zusätze für Kulturmedien verursacht.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Überlebensfähigkeit der Zellen (2) der Morula (7) oder der inneren Zellmasse (4) der Blastozyste (1) durch Zusatz geeigneter Antikörper herabgesetzt wird.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Herabsetzung der Überlebensfähigkeit der Zellen (2) der Morula (7) oder der Zellen der inneren Zellmasse (4) der Blastozyste (1) in einer auf die unterschiedlichen Differenzierungsgrade der Spenderzellen (6) abgestimmten und zeitlich wohlgeordneten Weise erfolgt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass vor dem Zuführen der Spenderzellen (6) in die Morula (7) oder der Blastozyste (1) die Spenderzellen (6) in Kulturschalen mit anderen Blastozysten oder aus anderen Blastozysten isolierten inneren Zellmassen in Kontakt gebracht werden, jene Spenderzellen mit relativ höherer Kontaktaffinität isoliert und der Morula (7) bzw. erstgenannten Blastozyste (1) zugeführt werden.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass vor dem Zuführen der Spenderzellen (6) in die Morula (7) oder Blastozyste (1) die Spenderzellen (6) mit einem genetischen Marker ausgestattet werden, die eine Isolierung von Zellen mit niedrigerem Differenzierungsgrad und deren Zuführen in die Morula (7) oder Blastozyste (1) gestatten.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Morula (7) oder

Blastozyste (1) um eine Maus-Morula oder Maus-Blastozyste handelt.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Morula (7) oder Blastozyste (1) um eine Schwein-Morula oder Schwein-Blastozyste handelt.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass bei Zufuhr der Spenderzellen (6) zu einer Blastozyste (1) die Zufuhr durch Injektion erfolgt.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass bei Zufuhr der Spenderzellen (6) zu einer Morula (7) die Zufuhr durch Aggregation erfolgt.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Spenderzellen (6) um humane Spenderzellen handelt.

~~20. Verwendung von gemäß Anspruch 19 erzeugten Zelllinien als Präparat zur diagnostischen und therapeutischen Intervention und für wissenschaftliche Zwecke bei Erkrankungen des Menschen.~~

21. Verwendung von gemäß Anspruch 19 erzeugten Zelllinien zur Erzeugung von Organstrukturen zur therapeutischen, diagnostischen oder wissenschaftlichen Anwendung bei Erkrankungen des Menschen.

22. Verwendung von gemäß Anspruch 19 erzeugten Zelllinien nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Erkrankungen des Menschen um ~~Herz/Kreislaufkrankungen, neurologische Erkrankungen,~~

~~Fortpflanzungsstörungen, Krebs, Augenerkrankungen, hormonelle Störungen, Lungenerkrankungen, metabolische Störungen, vererbte Erkrankungen, Erkrankungen des Bewegungs-, Stütz- und Bandapparates, Erkrankungen der Haut, des Knorpels und des Knochens, sowie Autoimmunstörungen handelt.~~

20

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei den Spenderzellen (6) um Spenderzellen nicht-humaner Säugetiere handelt.

~~24. Verwendung von gemäß Anspruch 23 erzeugten Zelllinien als Präparat zur diagnostischen und therapeutischen Intervention und für wissenschaftliche Zwecke bei Erkrankungen nicht-humaner Säugetiere.~~

25. Verwendung von gemäß Anspruch 23 erzeugten Zelllinien zur Erzeugung von Organstrukturen zur therapeutischen, diagnostischen oder wissenschaftlichen Anwendung bei Erkrankungen nicht-humaner Säugetiere.

26. Verwendung von gemäß Anspruch 23 erzeugten Zelllinien nach Anspruch 24 oder 25, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei den Erkrankungen des Säugetiers um Herz/Kreislaufkrankungen, neurologische Erkrankungen, Fortpflanzungsstörungen, Krebs, Augenerkrankungen, hormonelle Störungen, Lungenerkrankungen, metabolische Störungen, vererbte Erkrankungen, Erkrankungen des Bewegungs-, Stütz- und Bandapparates Erkrankungen der Haut, des Knorpels und des Knochens, sowie ~~Autoimmunstörungen handelt.~~